

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ENTEROPATÓGENOS EM CAPRINOS DO ESTADO DA
PARAÍBA.**

Rodrigo Augusto de Almeida Guimarães
Médico Veterinário

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ENTEROPATÓGENOS EM CAPRINOS DO ESTADO DA
PARAÍBA.**

Rodrigo Augusto de Almeida Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp

Comitê de Coorientação: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal do brejo paraibano.

2015

RODRIGO AUGUSTO DE ALMEIDA GUIMARÃES

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ENTEROPATÓGENOS EM CAPRINOS DO ESTADO DA
PARAÍBA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal do brejo paraibano.

APROVADA EM
BANCA EXAMINADORA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RODRIGO AUGUSTO DE ALMEIDA GUIMARÃES – João Pessoa, 10 de Outubro de 1978, possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Campina Grande (2004). Atualmente é médico veterinário da Prefeitura Municipal de Cabedelo, como Diretor da Vigilância Ambiental em Saúde. Médico Veterinário Autônomo e Responsável Técnico da Clínica Veterinária e Pet Shop Bicho de Praia.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho em especial à Deus, que nos momentos de desilusão me deu forças para seguir, e que sempre me guiou em minha vida.

A minha esposa Rossana Alberti Lucena, que sempre me deu forças e me estimulou a continuar aprendendo e estudando em minha vida.

Ao meu orientador Danilo Tancler Stipp, por entender minhas limitações de tempo e horários, e por ser sempre atencioso e disponível.

Aos colegas Domingos e Mauro, pelas incontáveis vezes que me ajudaram nas dúvidas e questionamentos. A todo pessoal do Laboratório de Análises de Produtos de Origem Animal por me receberem e disponibilizar as instalações para que se desenvolvessem as análises.

A minha família toda em especial a minha mãe Maria José e Irmã Rossana de Fátima, por sempre estarem ao meu lado.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	08
ABSTRACT	09
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
OBJETIVOS	15
CAPÍTULO I	16
CAPÍTULO II	30
CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	47

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Páginas

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de cadeia polimerase (PCR) para o fator K99. O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado à esquerda. Na figura A, as amostras 2, 6 e 10 apresentam-se positivas para o fator testado, na figura B a amostra 1 apresenta-se positiva. **22**

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de cadeia polimerase (PCR) para o fator Stx. O gel representa as amostras de 01 até 20, sendo 2 controles inseridos nos poços 11 e 12. O tamanho dos produtos de amplificação é exibido à esquerda. Na imagem as amostras 06 e 11 apresentam-se positivas para o fator testado..... **22**

Capítulo 2

Figura 01: Cultura de *E. coli*, mostrando o antibiograma contendo os seguintes antibióticos: ciprofloxacina, gentamicina e amoxicilina, demonstrando diferentes halos de inibição e penicilina demonstrando resistência. **34**

Figura 02: Cultura de *E. coli*, mostrando o antibiograma contendo os seguintes antibióticos: tetraciclina, lincomicina, vancomicina e Sulfametoxazol e Trimetopima, demonstrando multirresistência para tetraciclina, lincomicina, vancomicina..... **35**

Figura 03: Gráfico demonstrando representação da resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade entre as cepas isoladas..... **35**

Detecção e caracterização molecular de enteropatógenos em caprinos do estado da Paraíba.

RESUMO

Os prejuízos econômicos determinados pela diarreia neonatal à exploração econômica de animais resumem-se em aumentos nos custos diretos e indiretos da criação. Estudos realizados em outros estados da região nordeste também descrevem a diarreia como o principal problema sanitário no período neonatal que compromete o rebanhos caprino. Assim como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.; os rotavírus são relacionados a episódios de diarreia neonatal em rebanhos de diferentes espécies, principalmente bovinos e suínos, de vários países. Devido à carência de estudos, a etiologia das diarreias neonatais em rebanhos caprino na região nordeste brasileira é sistematicamente e de forma generalizada conferida às helmintoses. Este projeto teve como objetivo Avaliar a presença de enteropatógenos envolvidos em episódios de diarreia em caprinos de rebanhos do estado da Paraíba. A metodologia consistiu em visitas aos rebanhos caprinos das mesorregiões do estado da Paraíba, onde foram visitadas 24 propriedades. Foram coletadas 220 amostras de fezes diarreicas, de caprinos de até 90 dias de idade. As amostras foram submetidas à identificação de rotavírus por ss-PAGE. As estirpes isoladas foram submetidas a teste bioquímico para confirmação da espécie, seguido de teste para determinação dos grupos genotípicos, e análise filogenética. As amostras foram ainda submetidas à prova de suscetibilidade a antimicrobianos. Foram identificados isolados para *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella sonnei* e *Enterobacter aerogenes*. Destas foram obtidos 39 isolados de *E. coli*, sendo estas classificadas filogeneticamente em B2 (9/39), D (19/39), B1 (7/39) e A (4/29). Os fatores de virulência encontrados foram K99 (04/39) e Stx (02/39). À prova de suscetibilidade a antimicrobianos, apresentou isolados sensíveis à cloranfenicol, estreptomicina, amoxicilina e ciprofloxacina, sendo todos resistentes à lincomicina, vancomicina e penicilina. Os resultados mostraram que amostras provenientes de caprinos do Estado da Paraíba apresentaram *E. coli* pertencentes ao grupo filogenético B2 (9-23,07%) e D (19 –48,71%), e uma incidência de resistência aos antibióticos testados.

Palavras Chaves: rotavírus, *Escherichia coli*, diarreianeonatal, caprinocultura.

Detection and molecular characterization of enteric pathogens in goats of the Paraíba State, Brazil.

ABSTRACT - The economic losses determined by neonatal diarrhea to the economic exploitation of animals leads both directly and indirectly to an increase in the costs of breeding. Due to the lack of studies, the etiology of neonatal diarrhea in caprine herds of the northeast region of Brazil is systematically and generally conferred to helminthes. The importance of bacteria, protozoa and mainly viruses in the etiology of the episodes of neonatal diarrhea in caprine and ovine cattle is not yet properly characterized. The aim of this project was to evaluate the presence of enteropathogens involved in occurrences of diarrhea in herds of caprine in the state of Paraíba. The methodology consisted of visits to the caprine herds of mesoregions of the state of Paraíba. Was collected two hundred twenty diarrheal stool samples from caprine up to 90 days of age. The samples were submitted to rotavirus identification by ss-PAGE. The isolated strains were submitted to biochemical tests to confirm bacterial species, followed by the determination of serogroups and genotypic groups, as well the phylogenetic analyses. The samples were also submitted to antimicrobial susceptibility testing. Each one of the samples were negative to rotavirus. Isolates were identified to *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella sonnei* and *Enterobacter* classified phylogenetically in (9/39), D (19/39), B1 (7/39) and A (4/29). The virulence factors founded were K99 (04/39) and Stx (02/39). There were no positives isolates for K88, Sta,StbP and LT. To the antimicrobial susceptibility testing, the isolates were sensitive to Chloramphenicol, streptomycin, Amoxicillin and Ciprofloxacin, all of them being resistant to Lincomycin, Vancomycin and penicillin. The results showed that the samples derived from caprine from the state of Paraíba showed *E. coli* belonging to phylogenetic group B2 (9-23,07%) and D (19 –48,71%), and a high incidence of resistance against tested antibiotics.

Keywords: Rotavirus, *Escherichia coli*, Neonatal diarrhea, Goat.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Caprinocultura é a mais importante atividade pecuária na região Nordeste. O número de caprinos na região é de 7.841.373, e especificamente no estado da Paraíba é de 473.184 animais, correspondendo a 5,5% do plantel brasileiro (IBGE, 2012).

Estudos realizados em outros estados da região nordeste também descrevem a diarreia como a principal queixa clínica dos produtores. No estado do Ceará, as diarreias foram relatadas por 78,7% dos 124 produtores (PINHEIRO *et al.*, 2000). Em Pernambuco, 87,8% das 147 propriedades investigadas a diarreia foi a principal queixa clínica, sendo em muitos casos atribuída às helmintoses, coccidioses e também por etiologia não identificada (ALENCAR *et al.*, 2010).

Para melhor entendimento da etiologia das diarreias neonatais, é necessário que outras variáveis associadas sejam consideradas a este problema sanitário, como fatores determinantes ou predisponentes de origem infecciosa ou não. Fatores ambientais, nutricionais, assim como falhas de manejo zootécnico-sanitário, também estão entre as causas mais frequentes de diarreia de origem não infecciosa.

As causas infecciosas mais comuns incluem uma variedade de microrganismos enteropatogênicos como (*E. coli* enterotoxigênica – ETEC), *Salmonella* spp., e *Clostridium perfringens* tipo C, protozoários (*Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., e *Giardia* spp.), fungos (*Candida glabrata*) e vírus (rotavírus, coronavírus).

Com relação à etiologia viral, os rotavírus (RV) são considerados a principal causa de infecções entéricas em mamíferos e em espécies aviárias jovens em todo o mundo. Pertencente à família *Reoviridae*, os rotavírus, não apresentam envelope lipoprotéico e o capsídeo é constituído por três camadas concêntricas de proteínas. O genoma viral é formado por 11 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA). A gama de hospedeiros é extensa e, além de seres humanos, inclui várias espécies de animais de produção destacando-se, principalmente pelo impacto econômico que representa ao setor produtivo, as infecções em leitões, bezerros, cabritos e em aves jovens, como frangos de corte e perus (MCNULTY, 1978; ESTES *et al.*, 1981; HO *et al.*, 1988; ESTES e

COHEN, 1989; ALFIERI *et al.*, 2007). No Chile, (BERRÍOS *et al.*, 1988) identificaram RV em 15,6% (25/160) das amostras de fezes, por meio de ELISA, em cabritos com até quatro meses de idade apresentando ou não diarreia. Na Turquia, foi descrito a relação de dois surtos de diarreia por RV-A em dois rebanhos caprinos e em uma população vizinha de crianças (ALKHAN *et al.*, 2012). (GHOSH *et al.* 2010) identificaram em rebanhos caprinos de Bangladesh a presença de RV sorogrupo A (RV-A) em amostras de fezes diarreicas de animais com até três meses. No Brasil, o envolvimento de RV em caprinos foi descrito apenas em um surto de diarreia no estado de São Paulo (BUZINARO *et al.*, 2011).

Escherichia coli compreende a principal espécie bacteriana envolvida nos quadros de diarreia, sendo o agente mais predominante em animais com até uma semana de idade. Com forma bacilar, Gram negativa, anaeróbica facultativa e possuidora de flagelos peritríquios e cápsula, coloniza o intestino grosso, especialmente o cólon, do ser humano como de animais. A maioria das cepas de *E. coli* presentes no trato gastrointestinal são comensais e não patogênicas (NATARO e KAPER, 1998). No entanto, a expressão de um conjunto específico de genes é determinante para que esta espécie determine a enfermidade; conforme o padrão de genes associados à patogenicidade de um isolado, este pode ser classificado nos diferentes patótipos de *E. coli* (TENG *et al.*, 2004).

Os principais agentes de infecções intestinais são representados por membros da família *Enterobacteriace*. Dentre esses, têm destaque fundamental as categorias diarreiogênicas de *Escherichia coli*. *E. coli* pode ser classificada por mecanismos de patogenicidade (toxinas, adesinas, invasibilidade), danos a animais de laboratório e padrões de adesão a células eucarióticas em cultura, e seus patótipos incluem: i) *E. coli* enteropatogênica (EPEC); ii) *E. coli* enteropatogênica atípica (A-EPEC); iii) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); iv) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); v) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); vi) *E. coli* de adesão difusa (DAEC); vii) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (SOUZA, 2006). Vários sorotipos de *E. coli* têm sido implicados em doenças diarreicas, se constituindo num grave problema de saúde pública no mundo, com mais de dois milhões de mortes relatadas, a cada ano. (NATARO; KAPER, 1998)

A origem evolutiva de *E. coli*, especialmente de isolados extra-intestinais, tem sido estudada pela análise da presença de fatores de virulência em relação à organização populacional desta bactéria em diferentes grupos, a qual é definida por métodos filogenéticos (JOHNSON *et al.*, 2001). As análises filogenéticas têm demonstrado que as cepas podem ser classificadas em quatro grupos principais conhecidos para esta espécie, sendo: A, B1, B2 e D (CLERMONT *et al.*, 2000). As cepas virulentas são geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas são classificadas no grupo D. Já as cepas comensais pertencem aos grupos A e B1 (HERZER., 1990; LECOINTRE, 1998; SABATÉ *et al.*, 2006).

Os principais marcadores de patogenicidade são: *chuA*, um gene necessário para o heme transporte em *E. coli* enterro-hemorrágica (0157:H7) (MILLS; PAYNE, 1995; BONACORSI *et al.*, 2000); *yjaA*, um gene inicialmente identificado no genoma de *E. coli* K12, cuja função ainda é desconhecida (BLATTNER *et al.*, 1997) e um fragmento de DNA designado TSPE4.C2 (BONACORSI *et al.*, 2000).

Cepas enterotoxigênicas de *E. coli* causam diarreia aquosa profusa e/ou lesões vasculares sistêmicas devido à liberação de enterotoxinas como as toxinas termo-lábil (LT), termo-estável (Sta e Stb) e Shiga toxina (Stx2e) (FRANCIS, 2002), (WILSON e FRANCIS 1986) E (CASEY *et al.*, 1992) descreveram cinco diferentes tipos principais de fímbrias: K88, K99, 987P, F18 e F41 em isolados de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC). As fímbrias, também consideradas fatores de virulência, permitem a aderência dessas bactérias a receptores específicos localizados na superfície de enterócitos. A partir da aderência, essas bactérias colonizam a superfície celular e lá secretam as toxinas envolvidas no processo de diarreia. A colonização bacteriana e quadro clínico aparente da infecção são restritos a idade do animal, ou seja, caprinos neonatos são infectados mais frequentemente. Após a adesão, *E. coli* toxigênicas produzem toxinas (ST e LT) que induzem a hipersecreção pelas células do intestino ou que interferem com a síntese proteica das células (Stx2e) acarretando diarreia nos animais (HOLLAND, 1990; FAIRBROTHER e GYLES, 2006).

A maioria dos estudos envolvendo episódios de diarreia neonatal realizados no país não tinham objetivo de cunho epidemiológico, como a

detecção de agentes etiológicos de origem infecciosa; tratavam-se de estudos zootécnicos ou clínicos, como a caracterização da produção caprina, o relato de queixas clínicas de produtores frente às enfermidades encontradas ao longo da cadeia produtiva (PINHEIRO *et al.*, 2000; BANDEIRA *et al.*, 2007; ALENCAR *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011).

A importância dos agentes etiológicos é variável e o predomínio de um agente em países, regiões ou mesmo a sua distribuição sazonal, está diretamente relacionado com o grau de regularidade e intensidade com que medidas de caráter higiênico-sanitárias são adotadas (ELAD *et al.*, 1998).

Embora a maioria das causas de diarreia neonatal em uma variedade de animais esteja bem definida, existem alguns casos que ainda permanecem de origem desconhecida em decorrência de métodos laboratoriais ineficazes ou mesmo pela falta de estudos. Dentre aproximadamente 20 a 30% dos casos de enterite neonatal que compõem o grupo de diarreias, a etiologia não pode ser determinada (JANKE, 1989). Portanto, isto ressalta a importância do desenvolvimento de estudos epidemiológicos com a utilização de métodos diagnósticos sensíveis e específicos capazes de detectar a ampla variedade de enteropatógenos envolvidos nesta enfermidade.

Em vista destas considerações, a bactéria *Escherichia coli* pode ser caracterizada como importante patógeno emergente, pois, apesar de existir prevalentemente como comensal da microbiota da maioria dos animais de sangue quente, pode exibir mecanismos de virulência sendo responsável por significativas afecções clínicas em homens e animais. Dentre estas afecções podem se destacar: meningite neonatal, septicemia, infecções do trato urinário, e diarreia que pode se manifestar tanto de forma branda, auto-limitante quanto caracterizar quadros muito graves como a colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica (CORREIA *et al.*, 2007).

Os antimicrobianos, quando usados como promotores de crescimento na alimentação animal, podem exercer forte pressão seletiva sobre os patógenos e a microbiota saprofítica, principalmente quando utilizados abusivamente, podendo resultar no aparecimento de resistência quer seja na microbiota saprofítica e/ou patogênica, em dependência da codificação de genes para resistência antimicrobiana pela ação de plasmídeos e transposons (FRANCO *et al.*, 2010). A ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos

antimicrobianos pode ocasionar resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na terapêutica humana, dificultando o tratamento de enfermidades infecciosas humanas (MANTILLA *et al.*, 2008).

Além da virulência, a resistência a antimicrobianos em cepas de *E. coli* tem sido motivo de grande preocupação para a saúde pública, principalmente diante da evidência de que antibióticos exercem uma pressão seletiva tanto em bactérias patogênicas quanto nas comensais da microbiota. Desta forma, o aumento do uso de agentes antimicrobianos na clínica de pequenos animais, particularmente os de amplo espectro, tais como fluorquinolonas, cefalosporinas e penicilinas associadas ao ácido clavulâmico têm agravado o problema da resistência. A emergência de fenótipos de resistência de relevância clínica como, por exemplo, as betalactamases de espectro estendido (ESBL) e a multirresistência em cepas de *E. coli* de origem animal ilustram bem a gravidade do problema (AUTHIER *et al.*, 2006; CORREIA *et al.*, 2007).

Portanto, o crescente aumento da resistência aos agentes antimicrobianos, a possibilidade de transferência de fatores de virulência, a similaridade compartilhada por várias cepas de *E. coli* de animais e humanos e a percepção de que os animais de produção estão cada vez mais estreitamente relacionados ao homem, são os motivos que conduzem à presente investigação.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento de enteropatógenos envolvidos em episódios de diarreia neonatal em caprinos no estado da Paraíba.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a presença de rotavírus caprino em fezes diarreicas.
- Determinar os genes de virulência das Cepas de *E. coli* (K88, K99, StbP, StaP, Stx2E e LT) isoladas de fezes de caprinos.
- Identificar bioquimicamente e detectar os grupos filogenéticos (ChuA, YjaA e TspE) das cepas de *E. coli* isoladas de fezes de caprinos.
- Determinar o perfil de resistência das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de caprinos frente a diferentes drogas antimicrobianas.

CAPÍTULO I: Detecção de enteropatógenos e caracterização molecular de *Escherichia coli*, isoladas em caprinos do estado da Paraíba.

RESUMO

Os prejuízos econômicos determinados pela diarreia neonatal à exploração econômica de animais resumem-se em aumentos nos custos diretos e indiretos da criação como alterações significativas na conversão alimentar e desenvolvimento corporal, resultando queda da produtividade animal, e, conseqüentemente, menor peso ao desmame. Assim como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.; os rotavírus são relacionados a episódios de diarreia neonatal em rebanhos de diferentes espécies, principalmente bovinos e suínos, de vários países. Desta forma, a *Escherichia coli* pode ser caracterizada como importante patógeno emergente, pois, apesar do papel comensal na microbiota da maioria dos animais, pode expressar mecanismos de virulência responsáveis por significativas afecções clínicas em seres humanos e animais. *Escherichia coli* destaca-se entre os principais patógenos de importância na suinocultura e saúde pública e apresenta diversos patótipos, caracterizados pela presença de diferentes fatores de virulência. Os objetivos deste trabalho foram detectar genes de virulência e determinar a sua frequência. Foram coletadas 220 amostras de fezes diarreicas de caprinos com até 90 dias de idade. As amostras foram submetidas à identificação de rotavírus por ss-PAGE, depois cultivadas em meio seletivo e então obtivemos 117 colônias características para enterobactérias e estas foram submetidas a testes bioquímicos para confirmação da espécie. Em seguida foram realizados testes para determinação dos sorogrupos e análise filogenética. Todas as amostras foram negativas para rotavírus. Foram identificados isolados para *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella sonnei* e *Enterobacter aerogenes*. Destas foram obtidos 39 isolados de *E. coli*, sendo estas classificadas filogeneticamente em B2 (9/39), D (19/39), B1 (7/39) e A (4/29). Os fatores de virulência encontrados foram K99 (04/39) e Stx (02/39). Não houve isolados positivos para K88, Sta, StbP e LT. Os isolados de *E. coli* foram identificados como pertencentes a grupos de elevada virulência (B2 e D), sendo observados fatores de virulência (K99 e Stx) que indicam potencial patogênico significativo das amostras, apresentando provável relação com a causa de diarreia nos rebanhos investigados.

Palavras-chave: *E. coli*, rotavírus, bactérias, caprinos.

Detection of enteric pathogens and molecular characterization of *Escherichia coli*, isolated in goats of the Paraíba State.

ABSTRACT

The economical losses determined by neonatal diarrhea to the economical exploitation of animals can be summarized in increases in both the direct and indirect costs in breeding, such as significant changes on feeding conversion and bodily development yielding in lower animal productivity; and, consequently, lower weight in weaning. As well as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, the rotaviruses are related to occurrences of neonatal diarrhea in herds of different species, mainly bovine and porcine animals of various countries. Therefore, the *Escherichia coli* can be characterized as an important emergent pathogens, and although there is the commensal role in the microbial in most animals, virulence mechanisms can also be expressed as responsible for the significant clinical infections both in human beings and animals. *Escherichia coli* stands out among the main pathogens of importance in pig farming and public health, which also shows many types of pathogens characterized by the presence of different virulent factors. The aim of this project was to detect virulent genes and determine their frequency. 220 diarrheal stool samples were collected from caprine of up to 90 days of age. The samples were submitted to rotavirus identification by ss-PAGE, and then cultivated in the selective environment, and we had 117 characteristics for colonies for enterobacteria, and they were submitted to biochemical testing to confirm the specie. Then tests were carried out to determine the sorogroups and the genotypic groups, as well as phylogenetic analyses. All samples were negative for rotavirus. Isolates were identified to *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella sonnei* and *Enterobacter aerogenes*. Out of these samples thirty-nine *E. coli* isolates were obtained and classified phylogenetically in (9/39), D (19/39), B1 (7/39) and A (4/29). The virulence factor found were K99 (04/39) and Stx (02/39). There were no positives isolates for K88, Sta,StbP and LT. The isolates of *E. coli* were identified as belonging to groups of high virulence (B2 e D), being also observed the virulence factor (K99 e Stx) which indicates that the significant pathogenic potential in the samples, showing probable relation to the cause of diarrhea in the herds that were investigated

Key-words: *E. coli*, rotavirus, bacteria, caprine.

1. INTRODUÇÃO

Nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, caprinos e ovinos provêm alimento de alto valor nutricional a baixo custo, à base da subsistência. China e Índia possuem os maiores rebanhos do mundo, com 282 e 192,6 milhões de cabeças, respectivamente. O Brasil, com 9,31 milhões de cabeças, 91% dos caprinos concentram-se na região Nordeste, sendo Bahia e Pernambuco os estados com os maiores rebanhos do país (PRODETEC, 2011).

No Estado da Paraíba, a ocorrência de enteropatógenos envolvidos em episódios de diarreia em caprinos é incerta. Devido à carência de estudos, principalmente envolvendo animais neonatos, a causa etiológica muitas vezes não é avaliada ou mesmo, erroneamente ou precipitadamente, é conferida às helmintoses.

Escherichia coli é um dos agentes etiológicos mais frequentemente isolados em casos de diarreia em seres humanos e em diferentes espécies de animais (HOLLAND, 1990; NATARO e KAPER, 1998). A maioria das cepas de *E. coli* presentes no trato gastrintestinal são comensais, não patogênicas (NATARO e KAPER, 1998).

A origem evolutiva de *E. coli*, especialmente de isolados extra-intestinais, tem sido estudada pela análise da presença de fatores de virulência em relação à organização populacional desta bactéria em diferentes grupos, a qual é definida por métodos filogenéticos (JOHNSON, 2001; KOLLING, 2009). Nas análises filogenéticas tem-se verificado que cepas podem ser classificadas em quatro grupos principais conhecidos para esta espécie bacteriana, sendo: A, B1, B2 e D (CLERMONT *et al.*, 2000). As cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas são classificadas no grupo D. Por outro lado, as cepas comensais pertencem aos grupos A e B1 (HERZER, 1990; LECOINTRE, 1998; SABATÉ *et al.*, 2006). Cepas extra-intestinais patogênicas e comensais de *E. coli* diferem de acordo com os fatores de virulência, expressos por genes geralmente agrupados em ilhas de patogenicidade, proporcionando um mecanismo de transferência horizontal coordenada desses genes de virulência (SHERLEY *et al.*, 2004).

Três candidatos a marcadores de patogenicidade têm sido estudados: *chuA*, um gene necessário para o heme-transporte em *E. coli*

enterohemorrágica (0157:H7) (MILLS; PAYNE, 1995; BONACORSI *et al.*, 2000); *yjaA*, um gene inicialmente identificado no genoma de *E. coli* K12, cuja função ainda é desconhecida (BLATTNER *et al.*, 1997) e um fragmento de DNA designado TSPE4.C2 (BONACORSI *et al.*, 2000). Segundo (MACEDO *et al.*, 2012), cepas toxigênicas de *E. coli* causam diarreia aquosa profusa e/ou lesões vasculares sistêmicas devido à liberação de enterotoxinas como as toxinas termo-lábil (LT), termo-estável (Sta e Stb) e Shiga toxina (Stx2e) (FRANCIS, 2002).

As fímbrias, também consideradas fatores de virulência, permitem a aderência dessas bactérias a receptores específicos localizados na superfície de enterócitos. Cinco diferentes tipos principais de fímbrias foram descritos em isolados de *E. coli* toxigênicas (ETEC) de origem suína, sendo K88, K99, 987P, F18 e F41 (WILSON e FRANCIS 1986) e (CASEY *et al.* 1992). A partir da aderência, essas bactérias colonizam a superfície celular e lá secretam as toxinas envolvidas no processo de diarreia. Após a adesão, *E. coli* enterotoxigênicas produzem toxinas (ST e LT) que induzem a hipersecreção pelas células do intestino ou que interferem com a síntese proteica das células (Stx2e) acarretando diarreia nos animais (HOLLAND, 1990; FAIRBROTHER e GYLES, 2006).

O presente estudo teve como objetivo-se detectar cepas de *E. coli*, seus sorogrupos e genes de virulência a partir de isolados obtidos de fezes de caprinos com diarreia, identificando assim seu potencial patogênico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras e critérios de inclusão

No período de março de 2013 e maio de 2014 foram visitadas 24 propriedades no Estado da Paraíba de criação de caprinos para carne e para produção de leite, obtivemos 220 amostras de fezes diarreicas de caprinos com até 90 dias de idade, sendo armazenadas em frascos de coleta estéreis sob refrigeração. E então isolamos 117 amostras características para enterobactérias.

2.2. Extração do dsRNA e detecção de rotavírus

A extração do dsRNA foi realizada a partir de alíquotas de 400µL das amostras fecais, utilizando a técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico descrita por (THEIL *et al.*, 1981). Para a detecção de rotavírus caprino e identificação dos respectivos eletroferogramas foi realizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% seguida da coloração pela prata (ss-PAGE), segundo (PEREIRA *et al.*, 1983).

2.3. Cultura e isolamento bacteriológico

A identificação bacteriana foi feita em etapa prévia de enriquecimento em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e, posteriormente, semeadas em ágar Levine com incubação por 24 horas a 37,5°C, então as placas não sugestivas para enterobactérias foram descartadas e as sugestivas selecionamos 3 colônias e foram submetidas à análise bioquímica por meio de inoculação em meio TSI, Citrato, SIM, VM e VP, com leitura após 24 horas e análise de acordo com o Manual Bergey (WHITMAN, *et al.* 2012). As colônias sugestivas foram estocadas, mantidas em meio Triple Sugar Iron (TSI) e, posteriormente, transferidas para BHI glicerinado, sendo mantidas à temperatura de -20°C.

2.4. Extração de DNA e PCR multiplex

Os isolados foram enriquecidos em caldo BHI e novamente semeado sem Agar Mac Conkey, sendo incubados por 24 horas à 37°C. Colônias isoladas foram coletadas e ressuspensas em microtubo contendo 500µL de água estéril ultrapura. As suspensões foram aquecidas à 100°C por 10 minutos e, em seguida, mantidas em gelo por 10 minutos, e centrifugadas a 12.000 RPM por 3 minutos, sendo retirado ao final do processo o sobrenadante com o DNA bacteriano (COSTA, 2007).

Para a realização da técnica de multiplex-PCR (mPCR) foi preparada solução “master mix” composta de: 15µl de H₂O milli-Q, 2,5µl de tampão, 1µl MgCl₂, 1µl dNTPs, 1µl de cada primers (Tab 01) e 0,5µl Taq polimerase. Foram utilizados 22µl da solução “master mix” acrescido de 3µl de água estéril ultrapura como controle negativo. E 3µl de cada amostra de DNA. A amplificação dos genes *ChuA* (279pb) e *YjaA* (211pb) consistiu de

desnaturação a 94°C por 4 min.; seguido por 30 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 30s; com extensão final à 72°C por 7 min. A amplificação do gene TspE4C2 (152pb) consistiu de desnaturação a 94°C por 3 min.; seguido por 35 ciclos de 94°C por 3 min., 55°C por 1min. e 72°C por 45s; com extensão final à 72°C por 7 min (COSTA, 2007). A amplificação dos genes de virulência K99 (543pb), Stx (758pb), K88 (855pb), Sta (158pb), StbP (113pb) e LT (272pb) consistiu de 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 90s; com extensão final à 72°C por 10 min. O gel foi visualizado sob luz ultra violeta e fotografado. As figuras 01 e 02 apresentam os fatores positivos.

5. RESULTADOS

As amostras diarreicas foram submetidas à técnica de ss-PAGE para detecção de rotavírus, sendo todas negativas.

Os isolados foram submetidos às análises bioquímicas e identificadas resultando em 47% (55/117) de isolados indiferenciados, 33% (39/117) de isolados de *E. coli*, 10% (12/117) de *Shigella sonnei*, 6,83% (8/117) de *Enterobacter aerogenes*, 0,85% (1/117) de *Salmonella spp.*, 0,85% (1/117) *Providencia spp.*, e 0,85%, (1/117) de *Klebsiella pneumoniae*.

Os isolados de *E. coli* foram caracterizados genotipicamente e sendo 10,2% (4/39) pertencentes ao grupo A, 17,9% (7/39) ao grupo B1, 23,07% (9/39) ao grupo B2 e 48,71% (19/39) ao grupo D. Considerando que cepas virulentas são geralmente classificadas nos grupos B2 e D, 71,78% (28/39) das cepas caracterizadas são possíveis de serem patogênicas.

Seis (15%) amostras analisadas foram positivas para um ou mais fatores de virulência, sendo quatro (10,2%) positivas para K99 (Figura 1) e duas (5,12%) para Stx (Figura 2), indicando um possível potencial patogênico das amostras de acordo com (BACCARO *et al.*, 2000).

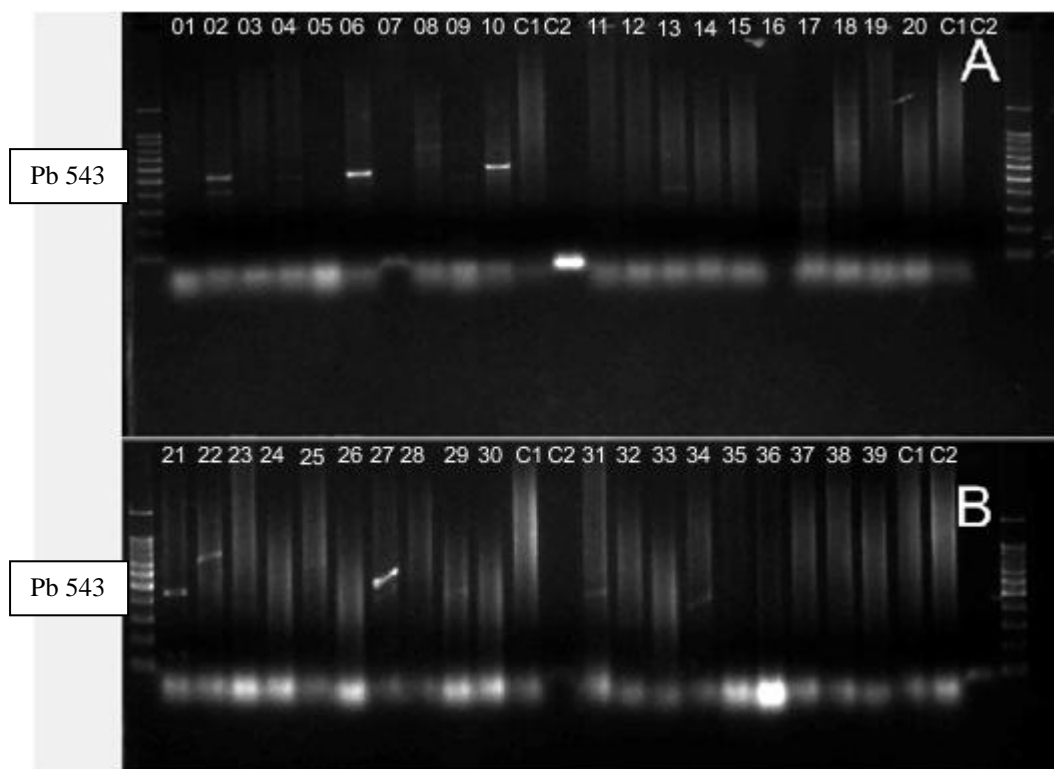


Figura 01: Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR) para o fator K99. O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado à esquerda. Na foto A, as amostras 2, 6 e 10 apresentam-se positivas para o fator testado, na foto B a amostra 1 apresenta-se positiva.

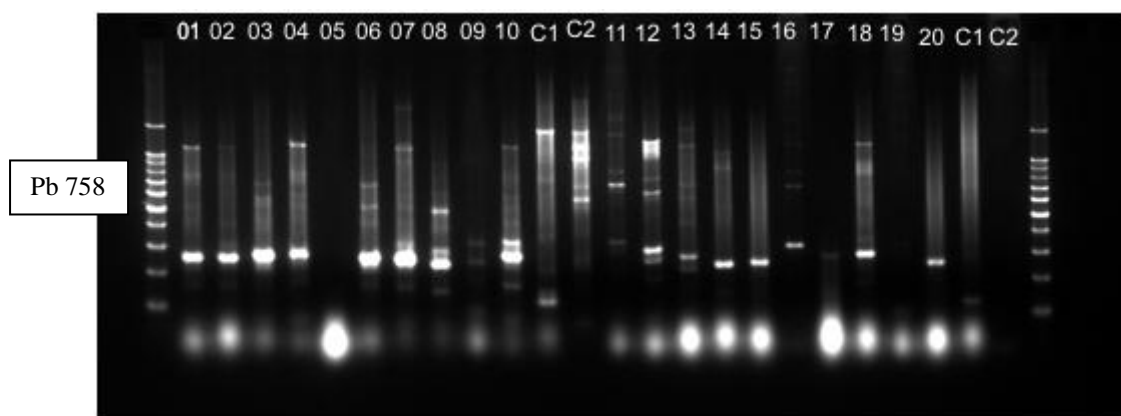


Figura 02: Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR) para o fator Stx. O gel representa as amostras de 01 até 20, sendo 2 controles inseridos nos poços 11 e 12. O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado à esquerda. Na imagem as amostras 06 e 11 apresentam-se positivas para o fator testado.

6. DISCUSSÃO

Diferentemente de outros estudos realizados, não foi possível determinar uma correlação entre a presença de diarreia e rotavírus, tendo em vista que no presente estudo não foi identificado rotavírus nas amostras analisadas (ALKAN *et al.*, 2012; BUZINARO *et al.*, 2011). Possivelmente por não ser uma fase de infecção ótima para a detecção do Rotavírus, ou simplesmente pela não presença deste patógeno nas amostras.

Foram analisadas estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de caprinos neonatos com até 90 dias, quanto à frequência de detecção; às características genotípicas; à identificação de genes de virulência de *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC); e ao perfil de resistência a diferentes antimicrobianos.

A análise filogenética determinou maior proporção de isolados classificados nos grupos B2 e D, sendo estes grupos os de maior virulência e com possibilidades de serem patogênicos. Estes resultados são diferentes aos encontrados por (LUGO NETO, 2014), e semelhantes ao descrito por (BINGEN *et al.* 1998) em humanos. No estudo de (KOLLING *et al.* 2009), demonstrou que as mais importantes cepas de *E. coli* encontrados pertenciam aos grupos B1 e D, diferente de dados obtidos em estudos com humanos, os quais observaram maior prevalência dos grupos A e B2. No Brasil outro estudo descreveu uma maior incidência de grupos D em amostras aviárias (CAMPOS *et al.* 2008). Amostras de origem humana são pertencem comumente ao grupo B2 (MAYNARD *et al.* 2004). Essas diferenças podem estar relacionadas com a alta sensibilidade a antimicrobianos e à maior ou menor virulência. Em comparação, cepas isoladas de animais são mais resistentes a antimicrobianos. Algumas variações podem estar associadas a regiões geográficas e/ou características individuais das espécies de hospedeiros (JHONSON *et al.* 2001).

Estudos sugerem que os isolados de *E. coli* podem ter uma origem múltipla, uma de linhagem patogênica e outra de linhagem não patogênica que possivelmente aperfeiçoada pela aquisição horizontal de genes virulentos (SILVEIRA *et al.*, 2002. BACCARO *et al.* 2000) pesquisaram genes de toxinas (Stx, Stb e LT) e fímbrias (K88, K99, 987P, F41) isoladas de suínos diarreicos e identificaram, respectivamente, 27,3% e 24,3% das amostras com fatores de

virulência. No presente este estudo, as frequências de detecção dos genes K99 foi de 10,25% e de 5,12% para o gene Stx, diferentemente do que foi descrito por estes autores.

(FAIRBROTHER *et al.* 2000) analisaram, por meio da PCR, isolados de *E. coli* de suínos com diarreia e constataram que em 75% e 65,5% dos casos, respectivamente, as amostras apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos genes, fimbriais (F18, F41, K88 e K99) ou de toxinas (Stx, Stb, LT e Stx2e) pesquisados. No entanto, a toxina Stx2e não foi incluída no estudo de (FAIRBROTHER *et al.* 2000). Em nosso trabalho as amostras foram positivas para apenas um dos genes testados, isto é as amostras positivas para toxina Stx não foram positivas para nenhum outro gene testado, e as amostras positivas para a fimbria K99 também não foram positivas a nenhum outro gen.

Concluimos que encontramos *E. coli*, com características e capacidade de ser ou se tornarem patogênicas para o homem e os animais foram encontradas em fezes de caprinos diarreicos, indicando a necessidade de estudos mais abrangentes nas demais regiões do país, tendo em vista o crescente aumento da produção caprina no País.

7. CONCLUSÃO

Todas as amostras foram negativas para rotavírus, indicando o não envolvimento do enteropatógeno nos episódios de diarreia em caprinos investigados.

Estudos mais abrangentes devem ser realizados para determinar a prevalência de RV nos quadros de diarreia em caprinos.

Os isolados de *E. coli* foram identificados como pertencentes a grupos filogenéticos de elevada virulência (B2 e D), sendo observados fatores de virulência (K99 e Stx) que indicam potencial patogênico significativo das amostras, apresentando provável relação com a causa de diarreia nos rebanhos investigados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA PRODETEC. Estudos e pesquisas. Disponível em: <http://www.agenciaprodetec.com.br/estudos-e-pesquisas/226-situacao-atual-e-desafios-a-enfrentar-na-criacao-de-ovinos-e-caprinos-no-nordeste>-Acesso em: 10 dez. 2014.

ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.F.; JIANG, B.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. **Journal of Virological Methods**, v.83, p.35-43, 1999.

ALKAN, Can et al. RNA-RNA interaction prediction and antisense RNA target search. **Journal of Computational Biology**, v. 13, n. 2, p. 267-282, 2006.

AN, H. *et al.* Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of eae, espA, espB and espD genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. **Microbial Pathogenesis**, v. 28, n. 5, p. 291-300, may., 2000.

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; CORRÊA, A. et al. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arq. Inst. Biol.**, v.69, p.15-18, 2002.

BEAUDRY, M. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 34, n. 1, p. 144-148, jan., 1996.

BERTSCHINGER, H. U.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E. **Diseases of swine**. Iowa: Iowa State University Press, 1999. Cap. 32, p. 431-468.

BERRÍOS, E.P.; NUNEZ, S.F.; CELEDON, V.M.O.; FIEGEHEN, C.P.; SANTIBANEZ, Z.M.C. Detection of rotavirus in goats in San Jose de Maipo, metropolitan region, Chile. **Avances-en-Ciencias-Veterinarias**, v.3, p.98-101, 1988.

BINGEN, Edouard et al. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 3, p. 642-650, 1998.

BLATTNER, F. R. *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, New York, USA, v. 277, n. 5331, p.1453-1461, sept., 1997.

BONACORSI, S. P. P., O. CLERMONT, C. TINSLEY, I. LE GALL, J. C. BEAUDOIN, J. ELION, X. NASSIF, AND E. BINGEN. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. **Infectum Immunologic**. 68: 2096–2101, 2000.

BRENNER, D. J. *et al.* Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, England, v. 23, p. 1-7, jan., 1973.

BRITO, B. G. *et al.* Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 34, n. 2, p. 645-652, mar./abr., 2004.

BRITO, B. G. *et al.* 1999, Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **VetMicrobiol** 65:123-132., 1999.

BUZINARO, M.G.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.B.; PONTES, J.V.; SALLES, R.; SILVA, D.G. Detecção e isolamento de rotavírus caprino do grupo A. **Arq. Inst. Biol.**, v.78, p.301-304, 2011.

CALIMAN, MARLY.; Estudo de Vigilância Bacteriológica: **Isolamento, Fatores de Virulência e Resistência Antimicrobiana** de Cepas de *Escherichia coli* isoladas de Gatos Domésticos na Região de Ribeirão Preto – Jaboticabal, 2010

CAMPOS, Tatiana Amabile de *et al.* Estudo clonal de *Escherichia coli* aviário por análise de seqüências de DNA conservadas do gene fliC. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 508-514, 2008.

CARVALHO, V. M. *et al.* Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (SPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 41, n. 3, p. 1225-1234, 2003.

CHAO, K. L.; DREYFUS L. A. Interaction of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, USA, v. 65, p. 3209–3217, aug., 1997.

CLERMONT, O; BONACORSI, S; BINGEN, E: Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Appl Environ Microbiol** 66:4555-4558, 2000.

COSTA, MATEUS MATIUZZI DA,. Caracterização patotípica de isolados de *Escherichia coli* obtidos de suínos: presença de plasmídeos e perfil de resistência aos antimicrobianos. **Tese de doutorado**, Porto Alegre, 2007

COSTA, M. M. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil, v. 39, p. 1-6, 2008.

FAIRBROTHER, J. M.; GYLES, C. L. *Escherichia coli* infections. **Diseases of swine**, v. 9, p. 639-674, 2006.

FILGUEIRA, T.M.B.; AHID, S.M.M.; SUASSUNA, A.C.D.; SOUZA, W.J.; FONSECA, Z.A.A.S. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na região da chapada do Apodi. **Revista Verde**, v.4, p.64-67, 2009.

GALINDO-CARDIEL, I.; FERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, M.; LUJÁND, L.; BUESA, L.; ESPADA, J.; FANTOVA, E.; BLANCO, J.; SEGALÉS, J.; BADIOLA, J.J. Novel group A rotavirus G8P[1] as primary cause of anovine diarrhoeal syndrome outbreak in weaned lambs. **Veterinary Microbiology**, v.149, p.467-471, 2011

GARG, A. X. et al. Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. **JAMA : The Journal of the American Medical Association**, USA, v. 290, p. 1360-1370, 2003.

GERBER, A. *et al.* Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: A prospective study. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 186, p. 493-500, aug., 2002.

GHOSH, S.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; TALUKDAR, R.I.; PAUL, S.K.; KOBAYASHI, N. Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. **Journal Genetic Virology**, v.91, p.2367-2373, 2010.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal Clinic Microbiology**, v.16, p.473-477, 1982.

HERZER, P. J. Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 172, p. 6175-6181, 1990.

HOLLAND, I. B.; KENNY, B.; BLIGHT, M. Haemolysin secretion from *E. coli*. **Biochimie**, v. 72, n. 2, p. 131-141, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2009. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/Tabela/protabl.asp?z=t&o=12&i=P>. Acesso em: 10dez.

JOHNSON, J. R. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 183, p. 78-88, jan., 2001.

KOLLING, Lilian. CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO PATOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* PATOGENOS E

COMENSAIS DE SUÍNOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL, **Dissertação de Mestrado**, Santa Maria, 2009.

LECOINTRE, G., *Escherichia coli* Molecular Phylogeny Using the Incongruence Length Difference Test. **Molecular Biology and Evolution**, USA, v. 15, n. 12, p. 1685-1695, 1998.

LORENZETTI, E. *et al.*, Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. **Veterinary Microbiology**, 154 191–196, 2011

LIMA, W. C., ATHAYDE, A. C.R., MEDEIROS, G. R., LIMA, D. A. S. D., BORBUREMA, J. B., SANTOS, E. M., VILELA, V. L.R. e AZEVEDO, S. S., Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 30(12):1003-1009, dezembro 2010

LECOINTRE, G., *Escherichia coli* Molecular Phylogeny Using the Incongruence Length Difference Test. **Molecular Biology and Evolution**, USA, v. 15, n. 12, p. 1685-1695, 1998.

LORENZETTI, E. *et al.*, Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. **Veterinary Microbiology**, 154 191–196, 2011

LIMA, W. C., ATHAYDE, A. C.R., MEDEIROS, G. R., LIMA, D. A. S. D., BORBUREMA, J. B., SANTOS, E. M., VILELA, V. L.R. e AZEVEDO, S. S., Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 30(12):1003-1009, dezembro 2010

LUGO NETO, D. F., Pesquisa de Rotavírus e Enterobactérias em Episódios de Diarreia Neonatal em Caprinos e Ovinos no Estado da Paraíba. **Dissertação de Mestrado**, Areia, 2014

MAYNARD, Christine *et al.* Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5444-5452, 2004.

MILLS, M.; PAYNE, S. Genetics and regulation of haem iron transport in *Shigelladysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 177, n. 11, p. 3004-3009, jun., 1995.

M McNULTY, M.S., ALLAN, G.M. E STUART, J.C. .Rotavirus infection in avian species .**Veterinary Record**, 103: 319-320, 1978.

NAKAZATO, G. *et al.* Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic

E. coli (EPEC). **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 101, n. 4, p. 269-277, aug., 2004.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, USA, v.11, n. 1, p. 142-201, jan., 1998.

PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.; BARTH, O.M.; SUTMOLLER, F.; FARIAS, V.; VIDAL, M.N. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, p.483–490, 1983.

SABATÉ M, MORENO E, PÉREZ T, ANDREU A, PRATS G: Pathogenicity and markers in commensal and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical Microbiology Infection** 12:880–886, 2006.

SARIDAKIS, H. O. *et al.* Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 54, n. 2, p. 145-153, feb., 1997.

SILVEIRA WDS, FERREIRA A, BROCCHI M, *et al.*: Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology** 85:47-53, 2002.

THEIL, K. W. *et al.* Rapid, simple method of preparing rotaviral double-stranded ribonucleic acid for analysis by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of clinical microbiology**, v. 14, n. 3, p. 273-280, 1981.

TOTH, I. *et al.* Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a Shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 69, n. 12, p. 7242-7247, dec., 2003.

WANI, S.A.; BHAT, M.A.; SAMANTA, I.; ISHAQ, S.M.; ASHRAFI, M.A.; BUCHH, A.S. Epidemiology of diarrhoea caused by rotavirus and *Escherichia coli* in lambs in Kashmir valley, India. **Small Ruminant Research**, v.52, p.145-153, 2004.

WHITMAN, W.B., GOODFELLOW, M., KÄMPFER, P., BUSSE, H.-J., TRUJILLO, M.E., LUDWIG, W., SUZUKI, K., Parte, A. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 5: The Actinobacteria Originally published by Williams & Wilkins*, 1984 2nd ed. 2012, 1750 p. 297 illus.

WILSON, R. A.; FRANCIS, D. H. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. **American journal of veterinary research**, v. 47, n. 2, p. 213-217, 1986.

CAPITULO II: DETECÇÃO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE CAPRINOS NEONATOS COM DIARREIA NO ESTADO DA PARAÍBA.

Artigo submetido à revista Ciência Animal Brasileira em 18 de janeiro de 2015.

Resumo—A diarreia neonatal determina alterações significativas na conversão alimentar e desenvolvimento corporal, resultando na queda da produtividade de rebanhos caprinos. A resistência antimicrobiana em bactérias de origem animal caracteriza-se como importante problema de saúde pública. Desta forma, a *Escherichia coli* pode ser caracterizada como importante patógeno emergente, pois, apesar do papel comensal na microbiota da maioria dos animais, pode expressar mecanismos de virulência responsáveis por significativas afecções clínicas em seres humanos e animais. O presente trabalho avaliou a presença de *E. coli* nas amostras e analisou a resistência antimicrobiana dos isolados. Foram coletadas 220 amostras de fezes diarreicas de caprinos com até 90 dias de idade. As colônias foram submetidas a testes bioquímicos para confirmação da espécie; posteriormente as amostras foram submetidas à prova de suscetibilidade a antimicrobianos. Foram identificados isolados de *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella sonnei* e *Enterobacter aerogenes*. Destas, foram obtidos 39 isolados de *E. coli*. À prova de suscetibilidade antimicrobiana, os isolados foram sensíveis à cloranfenicol, estreptomicina, amoxicilina e ciprofloxacina, sendo todos resistentes à lincomicina, vancomicina e penicilina. Os resultados revelaram que amostras provenientes de caprinos do Estado da Paraíba apresentaram *E. coli* com uma alta incidência de resistência a antibióticos comumente utilizados na caprinocultura.

Palavras-chave: *E. coli*, bactérias, caprinos e antibióticos

DETECTION AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM GOATS WITH DIARRHEA IN PARAÍBA STATE, BRAZIL.

Abstract: Neonatal diarrhea determines significant changes in nourishing conversion and corporal development, causing caprine herds to have their productivity decreased. The antimicrobial resistance in bacteria with animal origin is characterized as an important public health issue. Thus, the *Escherichia coli* can be characterized as important emergent pathogens; because, although there is a commensal role in the microbiota of most of the animals, it can also express the mechanisms of virulence responsible for significant clinical conditions in human beings and animals. The present work evaluated the presence of *E. coli* in the samples and analyzed the antimicrobial resistance of the isolates. A hundred and seventeen diarrheal stool samples were collected from caprine no older than 90 days of age. The colonies were submitted to biochemical testing to confirm the specie; later the samples were submitted to the susceptibility testing to antimicrobials. *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella sonnei* and *Enterobacter aerogenes* were identified. From such results, thirty-nine isolates of *E. coli* were obtained. To the antimicrobial susceptibility testing the isolated were sensitive to chloramphenicol, streptomycin, amoxicillin and ciprofloxacin, all of them being resistant to lincomycin, vancomycin and penicillin. The results showed that the samples derived from caprine from the state of Paraíba showed *E. coli* with a high incidence of resistance against antibiotics commonly used in goat raising.

Key-words: *E. coli*, bacteria, caprine and antibiotics

1 – Introdução

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* estão amplamente distribuídas na natureza, encontradas no solo, água, vegetais e no trato intestinal de seres humanos e animais (KONEMAN *et al.*, 2010)¹. Agrupados, arbitrariamente, em três categorias, os membros desta família podem ser: patógenos principais, que podem causar doenças entéricas e sistêmicas; patógenos oportunistas, que ocasionalmente causam doença clínica fora do trato alimentar e não-patógenos (QUINN, *et al.*, 2005)².

Além da virulência, a resistência a antimicrobianos em cepas de *E. coli* tem sido motivo de grande preocupação para a saúde pública, principalmente diante da evidência de que antibióticos exercem uma pressão seletiva tanto em bactérias patogênicas quanto nas comensais da microbiota intestinal. Desta forma, o aumento do uso de agentes antimicrobianos na clínica de pequenos animais, particularmente os de amplo espectro, tais como fluorquinolonas, cefalosporinas e penicilinas associadas ao ácido clavulâmico têm agravado o problema da resistência. A emergência de fenótipos de resistência de relevância clínica como, por exemplo, as betalactamases de espectro estendido (ESBL) e a multirresistência em cepas de *E. coli* de origem animal ilustram bem a gravidade do problema (ALLEN *et al.*, 2010)³.

Os antimicrobianos, quando usados como promotores de crescimento na alimentação animal, podem exercer forte pressão seletiva sobre os patógenos e a microbiota saprofítica, principalmente quando utilizados abusivamente, podendo resultar no aparecimento de resistência quer seja na microbiota saprofítica e/ou patogênica, em dependência da codificação de genes para resistência antimicrobiana pela ação de plasmídeos e transposons (CALIMAN 2010)⁴. A ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos antimicrobianos pode ocasionar resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na terapêutica humana, dificultando o tratamento de enfermidades infecciosas humanas (MANTILLA *et al.*, 2008)⁵.

A terapia antimicrobiana é comumente utilizada para controlar e prevenir infecções, mas esta prática pode selecionar bactérias resistentes. A resistência a drogas antimicrobianas pode ser carregada por plasmídeos, bem como mutações cromossômicas que ocorrem espontaneamente (LÁZÁR *et al.*, 2014)⁶. Resistência a multidroga têm sido descritas em humanos e suínos em isolados de *E. coli*. Bactérias formadoras de biofilmes é mais resistente a drogas antimicrobianas que estados livres de planctônicos, como foi determinado em outros patógenos veterinários, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* (COSTA *et al.* 2007)⁷.

Objetivou-se identificar cepas de *E. coli*, a partir de isolados obtidos de fezes de caprinos com diarreia, bem como determinar o perfil de resistência das cepas isoladas frente a diferentes antimicrobianos, e o crescente aumento da resistência aos agentes antimicrobianos, e a presença de multirresistência a drogas.

2. Material e Métodos

2.1. Amostras e critérios de inclusão

No período de março de 2013 e maio de 2014 foram visitadas 24 propriedades no Estado da Paraíba de criação de caprinos para carne e para produção de leite, obtivemos 220 amostras de fezes diarreicas de caprinos com até 90 dias de idade, sendo armazenadas em frascos de coleta estéreis sob refrigeração. E então isolamos 117 amostras características para enterobactérias.

2.2 Cultura e isolamento bacteriológico

A identificação bacteriana foi feita em etapa prévia de enriquecimento em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e, posteriormente, semeadas em meio Levine com incubação por 24 horas a 37,5°C, então as placas não sugestivas para enterobactérias foram descartadas e das sugestivas selecionamos 3 colônias e foram submetidas à análise bioquímica por meio de inoculação em meio TSI, Citrato, SIM, VM e VP, com leitura após 24 horas e análise de acordo com o Manual Bergey (WHITMAN, *et al.* 2012)⁸. As colônias sugestivas foram estocadas, mantidas em caldo Triple Sugar Iron (TSI) e, posteriormente, transferidas para BHI glicerinado, sendo mantidas sob à temperatura de -20°C até o seu uso.

2.3. Sensibilidade a antimicrobianos

Para o teste de sensibilidade a antimicrobianos foi utilizada a técnica de difusão em ágar, segundo as recomendações de (WOODS e WASHINGTON 1995)⁹. A partir das amostras de *E. coli* isoladas em ágar triptona de soja por 24h a 37°C, foi utilizado uma solução salina autoclavada e diluída colônias de bactérias até atingir o equivalente à escala 0,5 MacFarland e semeadas em ágar Muller-Hinton. As placas foram incubadas por 18h a 37°C. Foram utilizados discos de: amoxicilina e ácido clavulâmico (AMC) (30µ), ampicilina (AMP) (10µ), cefalexina (CFE) (30µ), ciprofloxacina (CIP) (5µ), cloranfenicol (CLO) (30µ), estreptomicina (EST) (300µ), gentamicina (GEN) (10µ), lincomicon (LIN) (2µ), penicilina G (PEN) (10µ), sulfametoxazol e trimetoprima (SUT) (25µ), tetraciclina (TET) (30µ), vancomicina (VAN) (30µ). Após a incubação os halos de inibição foram medidos e os padrões de susceptibilidade foram determinados segundo o manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007)¹⁰.

3. Resultados

As amostras foram submetidas às análises bioquímicas e identificadas resultando em 47% (55/117) de isolados bioquimicamente indiferenciados, 33% (39/117) de isolados de *E. coli*, 10% (12/117) de *Shigella sonnei*, 6,83% (8/117) de *Enterobacter aerogenes*, 0,85% (1/117) de *Salmonella* spp., 0,85% (1/117) *Providencia* spp. e 0,85%, (1/117) de *Klebsiella pneumoniae*.

A escolha dos 12 agentes antimicrobianos para verificar as suscetibilidades entre os isolados clínicos foi baseada em protocolos sugeridos pela (CLSI, 2007)¹⁰ para Enterobactérias Gram negativas. Os antibióticos testados são de uso frequente na clínica veterinária de animais de produção.

A prova de sensibilidade a antimicrobianos demonstrou que todas as amostras foram resistentes à lincomicina, vancomicina e penicilina, seguido de 38,46% (15/39) à tetraciclina, 35,89% (14/39) à cefalexina, e 33,33% (13/39) à sulfametoxazol e trimetopima. A sensibilidade bacteriana foi observada aos antimicrobianos foi de 92,30% (36/39) para estreptomicina, amoxicilina e ácido clavulânico, e cloranfenicol (Fig. 1).



Figura 1: Cultura de *E. coli*, contendo os seguintes antibióticos: ciprofloxacina, gentamicina e amoxicilina, demonstrando diferentes halos de inibição e penicilina demonstrando resistência.

Multirresistência a drogas (MDR), caracterizada como a resistência a três ou mais agentes antimicrobianos, foi encontrada nas amostras, sendo de até 100%. O fenótipo mais frequente de MDR foi o da resistência a penicilina, vancomicina e lincomicina de 100% das cepas (Fig. 2).



Figura 2: Cultura de *E. coli*, contendo os seguintes antibióticos: tetraciclina, lincomicina, vancomicina e sulfametoxazol e trimetopima, demonstrando multirresistência para tetraciclina, lincomicina, vancomicina.

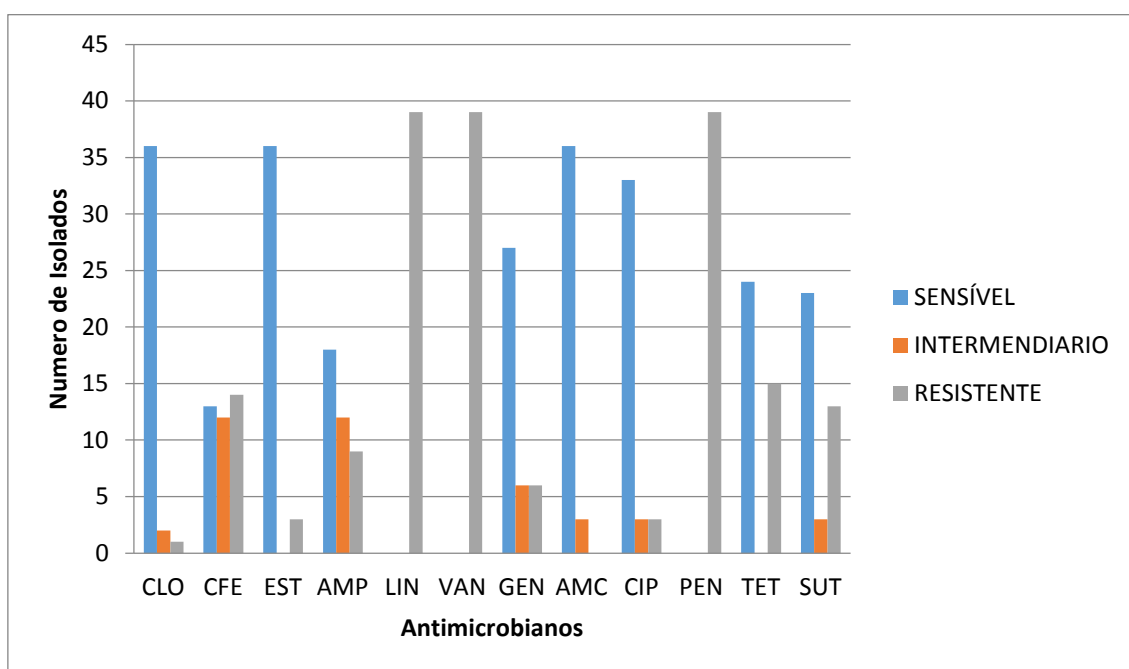


Figura 3: Gráfico demonstrando representação da resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade entre as cepas isoladas.

4. Discussão

A caracterização de *E. coli* quanto ao padrão de resistência a antibióticos e a identificação do padrão de virulência são informações fundamentais para a caracterização de isolados clínicos, tanto de animais, como da água e do ambiente; e

possibilitam discriminar o potencial patogênico dessas bactérias e a identificação de clones patogênicos emergentes (IKUNO *et al.* 2008¹¹, BARROS *et al.*, 2012¹²). Bactérias possuem ampla distribuição nas diferentes espécies de hospedeiros e no meio ambiente. Além disso, podem apresentar multirresistência a antimicrobianos comumente utilizados na produção (PARVEEN *et al.*, 2006¹³; PATERSON *et al.*, 2006¹⁴). Segundo Albuquerque (2005)¹⁵, a lincomicina é um dos antimicrobianos autorizados no Brasil para uso na avicultura, como aditivo na alimentação. O uso de antibióticos nas medicina veterinária e humana é considerado um fator importante para promover a seleção e disseminação de microrganismos resistentes (WHITE *et al.* 2001¹⁶, OGUNLEYE *et al.* 2008¹⁷). Neste trabalho verificou-se também que, independentemente do tipo de criação, os isolados de *E. coli* apresentaram resistência de 100,0% para lincomicina (IKUNO *et al.* 2008)¹¹ também obtiveram resultados semelhantes em isolados de *E. coli* obtidos de aves silvestres. A produção da enzima Beta-lactamase é o mais comum mecanismo de produção de resistência frente a antibióticos beta-lactâmicos em bactérias Gram negativas. O uso contínuo de antibióticos de amplo espectro induzem a produção destas enzimas (DOLEJSKA *et al.* 2007)¹⁸.

Dentre os isolados analisados, todos apresentaram resistência a pelo menos três dos agentes antimicrobianos testados e 75% apresentaram resistência a mais de três antimicrobianos. A multirresistência tem sido citada por diversos autores (BACCARO *et al.*, 2002¹⁹; GUERRA *et al.*, 2003²⁰) apresentando níveis mais elevados em cepas isoladas de suínos quando comparada a bovinos e ovelhas, fato que se deve à pressão seletiva causada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, provavelmente na ração animal como promotor de crescimento (ENNE *et al.*, 2008)²¹. Esta resistência é preocupante, pois pode potencialmente se espalhar para humanos, tanto através da colonização direta do intestino humano por cepas de *E. coli* animal quanto pela transmissão de genes de resistência a bactérias residentes no intestino humano. (MORA *et al.*, 2005)²²

O maior índice de sensibilidade foi observado para amoxicilina, ácido clavulânico, estreptomicina e cloranfenicol, em 92,30% dos isolados; seguido por ciprofloxacina em 84,61% dos isolados. Estudo realizado por (FRANCO *et al.*, 2010)⁴ em carcaças suínas, obtiveram porcentagem semelhante ao do presente estudo em relação à sensibilidade dos isolados à ciprofloxacina, com 88,2%. Porém, houve diferença em relação a nitrofurantoína, onde apenas 17,6% dos isolados foram sensíveis. A divergência observada pode ser atribuída à variabilidade das estirpes e ao crescente

aumento da resistência antimicrobiana entre as enterobactérias (COSTA *et al.* 2006)²³. Os antimicrobianos Sulfametoxazol e Trimetoprim, 87,5% dos isolados foram sensíveis, resultado semelhante ao descrito por (VARGA *et al.*, 2008)²⁴, que verificaram 93,6% dos isolados de *E. coli*, de suínos saudáveis, sensíveis ao mesmo. A maior resistência dos isolados foi observada para tetraciclina com 93,7%. Isto não é surpreendente, uma vez que a tetraciclina é utilizada há muitos anos como promotor de crescimento para animais.

Apesar de sua proibição de uso em animais de produção, um isolado (2,56%) foi resistente ao Cloranfenicol, e dois isolados (5,12%) com sensibilidade intermediária, indicando seu possível uso em animais de produção. A presença de resistência para Cloranfenicol indica um sério problema à saúde pública. Desta maneira, monitorar a resistência de bactérias isoladas de animais a diferentes grupos de antibióticos torna-se um fator determinante para eleição e êxito do tratamento, bem como eliminar, através do uso de antibióticos específicos, a presença de linhagens carreadoras de genes relacionados à patogenicidade de *E. coli*.

5. Conclusão

A alta taxa de resistência antimicrobiana entre algumas drogas testadas, implica em uma necessidade de controle das drogas disponíveis para o uso em Medicina Veterinária, e também a necessidade de descoberta de novas drogas que não possuam um índice de resistência alto.

O cloranfenicol, gentamicina juntamente com a estreptomicina apresentaram a melhor taxa de sensibilidade, porém o cloranfenicol apresentou amostras resistentes, alertando para seu possível uso em animais de produção.

Três drogas tiveram resistência de 100%, sendo elas lincomicina, vancomicina e penicilina.

O uso de antimicrobianos deve seguir protocolos criteriosos para ajudar a conter a resistência. Diagnóstico seguro do micro-organismo envolvido nas infecções como uma importante etapa deste processo.

Além disso, atualizações constantes sobre o estado de resistência aos antimicrobianos mais utilizados na medicina veterinária são necessárias.

6 – Referências

1. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Dowell JR., V.R.; Sommers, H.M. Diagn. Microbiol. Texto e atlas colorido. 2ª ed. São Paulo, Editora Panamericana, p. 61- 132, 1997.
2. Quinn P, Markey B, Carter M, Donnelly W, F Leonard. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. São Paulo: Artmed; 2005.
3. Allen H, Donato J, Wang, Cloud-Hansen K, Davies J e Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY. Vol. 8 p. 251-259, APRIL 2010
4. Caliman Marly Cristina Wanderley M. Estudo de vigilância bacteriológica: Isolamento, fatores de virulência e Resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de gatos domésticos na Região de ribeirão preto. Jaboticabal, 2010.
5. Mantilla S, Franco R, Oliveira L, Santos E e Gouvêa E. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 45, n. 2, p. 116-121, 2008.
6. Lázár V, Nagy I, Spohn R, Csörg B, Györkei A, Nyerges A, et al. Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network. NATURE COMMUNICATIONS. 2014; 5:4352 DOI: 10.1038/ncomms5352
7. Costa, Mateus Matiuuzzi da,. Caracterização patotípica de isolados de *Escherichia coli* obtidos de suínos: presença de plasmídeos e perfil de resistência aos antimicrobianos. Tese de doutorado. Porto Alegre, 2007
8. Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo M, Ludwig W, et al.. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 5: The Actinobacteria Originally published by Williams & Wilkins, Illinois 1984 2nd ed. 2012, 1750 p. 297.
9. Woods, G.L.; Washington, J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A. et al. Manual of clinical microbiology. 6.ed. Washington: ASM Press, 1995. p.1327-1341.
10. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
11. Ikuno A, Gama N, Guastalli E, Guimarães M e Ferreira V. Características de isolados de *Escherichia coli* provenientes de aves silvestres quanto a genes de virulência e resistência a antibióticos. In: Anais 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet.), 2008. Gramado, RS.
12. Barros M, Silveira W, Araújo J, Costa E, Oliveira A e Santos A. Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. Pesq. Vet. Bras. 32 (5): 405-410, maio 2012.
13. Parveen S, Lukasik J, Scott T, Tamplin M, Portier K, Sheperd S. et al. Geographical variation in antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from swine, poultry, beef and dairy cattle farm water retention ponds in Florida. Journal of Applied Microbiology. January 2006, Volume 100, Issue 1, pages 50–57.

14. Paterson David L., Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. The American Journal of Medicine. June 2006, Volume 119, Issue 6, Supplement 1, Pages S20–S28.
15. Albuquerque, R. Antimicrobianos como promotores do crescimento. Farmacologia aplicada à avicultura: Boas práticas no manejo de medicamentos. São Paulo, 2005. Roca, 149-159.
16. White D, Zhao S, Sudler R, Ayers S, Friedman S, Chen S, et al. The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. The New England Journal of Medicine, October 2001, Volume 345, No. 16, p 1147-1154.
17. Akinlabi Oladele Ogunleye A, Oyekunle M e Sonibare A. Multidrug resistant *Escherichia coli* isolates of poultry origin in Abeokuta, South Western Nigeria. Veterinarski Arhiv. 2008, Volume 78 (6), p 501-509.
18. Dolejska M, Cizek A e Literak I. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. Journal of Applied Microbiology VL - 103-1, Blackwell Publishing Ltd. 2007 - 1365-2672. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03241> DOI - 10.1111/j.1365-2672.2006.03241.x. p 11 – 19.
19. Baccaro, M.R.; Moreno, A.M.; Corrêa, A. et al. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. Arq. Inst. Biol., v.69, p.15-18, 2002.
20. Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S e Helmuth R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003 52, 489–492. DOI: 10.1093/jac/dkg362.
21. Enne V, Cassar C, Sprigings K, Woodward M J & Bennett P M. A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. FEMS Microbiol Lett, January 2008, 278, 193–199.
22. Mora, A.; Blanco, J. E.; Blanco, M.; Alonso, M. P.; Dhabi, G.; Echeita, A. et al, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. Research in Microbiology, 2005, v. 156, n. 7, p. 793-806.
23. Costa, M.M.; Silva, M.A.; Spricigo, D.A. et al. Caracterização epidemiológica e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira, 2006, v.26, p.5-8.
24. Varga C, Rajić A, McFall M, Avery B, Reid-Smith R, Deckert A, et al. Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolated from swine fecal samples in 90 Alberta finishing farms. The Canadian Journal of Veterinary Research. 2008 ; 72: P.175–180.

7. CONCLUSÃO

- Todas as amostras foram negativas para rotavírus, indicando o não envolvimento do enteropatógeno nos episódios de diarreia em caprinos investigados.
- Estudos mais abrangentes devem ser realizados para determinar a prevalência de RV nos quadros de diarreia em caprinos.
- Os isolados de *E. coli* foram identificados como pertencentes a grupos filogenéticos de elevada virulência(B2 e D), sendo observados fatores de virulência (K99 e Stx) que indicam potencial patogênico significativo das amostras,apresentando provável relação com a causa de diarréia nos rebanhos investigados.
- Os isolados de *E. coli* apresentaram maior sensibilidade antimicrobiana à estreptomicina e ampicilina, o que pode representar uma maior eficácia quando utilizados no tratamento de infecções nas bactérias analisadas.

Referências

- AGÊNCIA PRODETEC. Estudos e pesquisas. Disponível em: <http://www.agenciaprodetec.com.br/estudos-e-pesquisas/226-situacao-atual-e-desafios-a-enfrentar-na-criacao-de-ovinos-e-caprinos-no-nordeste>. Acesso em: 10 dez. 2014.
- ALENCAR, S.P.; MOTA, R.A.; NASCIMENTO, S.A.; COELHO, M.C.O.C.; ABREU, S.R.O.; CASTRO, R.S. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, p.131-140, 2010.
- ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.F.; JIANG, B.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. **Journal of Virological Methods**, v.83, p.35-43, 1999.
- AN, H. *et al.* Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of eae, espA, espB and espD genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. **Microbial Pathogenesis**, v. 28, n. 5, p. 291-300, may., 2000.
- AUTHIER, S.; PAQUETTE, D.; LABREQUE, O; SERGE, M. Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacteria isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. **Can. Vet.**, v. 47, p. 774-778, 2006.
- BANDEIRA, D.A.; CASTRO, R.S.; MELO, L.S.S.; MELO, C.B.; AZEVEDO, E.O. Características de produção da caprinocultura leiteira na região do Cariri na Paraíba. **Ciência Veterinária Tropical**, v.10, p.29-35, 2007.
- BEAUDRY, M. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 34, n. 1, p. 144-148, jan., 1996.
- BERTSCHINGER, H. U.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E. **Diseases of swine**. Iowa: Iowa State University Press, 1999. Cap. 32, p. 431-468.
- BERRÍOS, E.P.; NUNEZ, S.F.; CELEDON, V.M.O.; FIEGEHEN, C.P.; SANTIBANEZ, Z.M.C. Detection of rotavirus in goats in San Jose de Maipo, metropolitan region, Chile. **Avances-en-Ciencias-Veterinarias**, v.3, p.98-101, 1988.
- BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; CORRÊA, A. *et al.* Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arq. Inst. Biol.**, v.69, p.15-18, 2002.

BLATTNER, F. R. *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, New York, USA, v. 277, n. 5331, p.1453-1461, sept., 1997.

BONACORSI, S. P. P., O. CLERMONT, C. TINSLEY, I. LE GALL, J. C. BEAUDOIN, J. ELION, X. NASSIF, AND E. BINGEN. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. **Infectum Immunologic**. 68: 2096–2101, 2000.

BRENNER, D. J. *et al.* Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, England, v. 23, p. 1-7, jan., 1973.

BRITO, B. G. *et al.* Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 34, n. 2, p. 645-652, mar./abr., 2004.

BRITO, B. G. *et al.* 1999, Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **VetMicrobiol** 65:123-132., 1999.

BUZINARO, M.G.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.B.; PONTES, J.V.; SALLES, R.; SILVA, D.G. Detecção e isolamento de rotavírus caprino do grupo A. **Arq. Inst. Biol.**, v.78, p.301-304, 2011.

CALIMAN, MARLY.; Estudo de Vigilância Bacteriológica: **Isolamento, Fatores de Virulência e Resistência Antimicrobiana** de Cepas de *Escherichia coli* isoladas de Gatos Domésticos na Região de Ribeirão Preto – Jaboticabal, 2010

CALDAS, E.M.; SANTANA, A.F.; CAETANO, A.L.S.; Estudo da ovinocaprinocultura na região Nordeste do Estado da Bahia. **Arquivo Escola Medicina Veterinária**, v.12, p.1-98, 1989.

CARVALHO, V. M. *et al.* Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (SPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 41, n. 3, p. 1225-1234, 2003.

CHAO, K. L.; DREYFUS L. A. Interaction of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, USA, v. 65, p. 3209–3217, aug., 1997.

CLERMONT, O; BONACORSI, S; BINGEN, E: Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Appl Environ Microbiol** 66:4555-4558, 2000.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, **PA: Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2007.

COSTA, MATEUS MATIUZZI DA,. Caracterização patotípica de isolados de *Escherichia coli* obtidos de suínos: presença de plasmídeos e perfil de resistência aos antimicrobianos. **Tese de doutorado**, Porto Alegre, 2007

COSTA, M. M. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil, v. 39, p. 1-6, 2008.

CORREIA, C.; COSTA, E.; PERES, A.; ALVES, M.; POMBO, G.; ESTEVINHO, L.; Etiologia das infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. **Acta Med. Port.**, v. 20, p. 543-549, 2007.

COSTA, M.M.; SILVA, M.A.; SPRICIGO, D.A. *et al.* Caracterização epidemiológica e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras**, v.26, p.5-8, 2006.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2007.

DOUGAN, G. *et al.* The *Escherichia coli* gene pool. **Current Opinion in Microbiology, England**, v. 4, n. 1, p. 90-94, 2001.

ELAD, D.; BRENNER, A.; MARKOVICS, B.; YAKOBSON, S.; SHLOMOVITZ, S.; BASAN, J. Yeasts in the gastrointestinal tract of preweaned calves and possible involvement of *Candida glabrata* in neonatal calf diarrhea. **Mycopathologia**, v.141, p.7-14, 1998.

ENNE V, CASSAR C, SPRIGINGS K, WOODWARD M J & BENNETT P M. A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. **FEMS Microbiol Lett**, January 2008, 278, 193–199.

FILGUEIRA, T.M.B.; AHID, S.M.M.; SUASSUNA, A.C.D.; SOUZA, W.J.; FONSECA, Z.A.A.S. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na região da chapada do Apodi. **Revista Verde**, v.4, p.64-67, 2009.

GALINDO-CARDIEL, I.; FERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, M.; LUJÁND, L.; BUESA, L.; ESPADA, J.; FANTOVA, E.; BLANCO, J.; SEGALÉS, J.; BADIOLA, J.J. Novel group A rotavirus G8P[1] as primary cause of anovine diarrheic syndrome outbreak in weaned lambs. **Veterinary Microbiology**, v.149, p.467-471, 2011

GARG, A. X. *et al.* Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. **JAMA : The Journal of the American Medical Association**, USA, v. 290, p. 1360-1370, 2003.

GERBER, A. *et al.* Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic–uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: A prospective study. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 186, p. 493-500, aug., 2002.

GHOSH, S.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; TALUKDAR, R.I.; PAUL, S.K.; KOBAYASHI, N. Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. **Journal Genetic Virology**, v.91, p.2367-2373, 2010.

HENTON, M. M.; HUNTER, P. *E. coli* infections. In: COETZER, J. A. W. *et al.* Infectious Diseases of Livestock. **Oxford University Press**, 1994.p.1085-1099.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal Clinic Microbiology**, v.16, p.473-477, 1982.

HERZER, P. J. Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single- stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 172, p. 6175-6181, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2009. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/Tabela/protabl.asp?z=t&o=12&i=P>. Acesso em: 10dez

JANKE, B.H. Symposium on neonatal calf diarrhea. **Veterinary Medicine**, v.84, p.803-810, 1989.

JOHNSON, J. R. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 183, p. 78-88, jan., 2001.

KARMALI, M. *et al.* The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **The Journal of infectious diseases**, USA, v. 151, p. 775–782, may, 1985.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL JR., V.R.; SOMMERS, H.M. Diagn. Microbiol. **Texto e atlas colorido**. 2ª ed. São Paulo, Editora Panamericana, p. 61- 132, 1997.

LÁZÁR V, NAGY I, SPOHN R, CSÖRG B, GYÖRKEI A, NYERGES A, *et al.* Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network. **Nature communications**. 2014; 5:4352 DOI: 10.1038/ncomms5352

LECOINTRE, G., *Escherichia coli* Molecular Phylogeny Using the Incongruence Length Difference Test. **Molecular Biology and Evolution**, USA, v. 15, n. 12, p. 1685-1695, 1998.

LORENZETTI, E. *et al.*, Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. **Veterinary Microbiology**, 154 191–196, 2011

LIMA, W. C., ATHAYDE, A. C.R., MEDEIROS, G. R., LIMA, D. A. S. D., BORBUREMA, J. B., SANTOS, E. M., VILELA, V. L.R. e AZEVEDO, S. S., Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 30(12):1003-1009, dezembro 2010

LUGO NETO, D. F. Pesquisa de Rotavírus e Enterobactérias em Episódios de Diarreia Neonatal em Caprinos e Ovinos no Estado da Paraíba. **Dissertação de Mestrado**, Areia, 2014

MILLS, M.; PAYNE, S. Genetics and regulation of haem iron transport in *Shigelladysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 177, n. 11, p. 3004-3009, jun., 1995.

MCNULTY, M.S., ALLAN, G.M. E STUART, J.C. .Rotavirus infection in avian species .**Veterinary Record**, 103: 319-320, 1978.

NAKAZATO, G. *et al.* Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 101, n. 4, p. 269-277, aug., 2004.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, USA, v.11, n. 1, p. 142-201, jan., 1998.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.52, p.110-117, 2000.

SABATÉ M, MORENO E, PÉREZ T, ANDREU A, PRATS G: Pathogenicityislandmarkers in commensalanduropathogenic *Escherichia coli* isolates. **ClinicMicrobiologyInfection** 12:880–886, 2006.

SANTOS, T.C.P.; ALFARO, C.E.P.; FIGUEIREDO, S.M. Aspectos sanitários e de manejo em criações de caprinos e ovinos na microrregião de Patos, região semi-árida da Paraíba. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, p.206-212, 2011.

SARIDAKIS, H. O. *et al.* Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 54, n. 2, p. 145-153, feb., 1997.

SOBESTIANSKY, J. *et al.* **Clínica e Patologia Suína**, 2 ed. Goiânia: J. Sobestiansky, 1999. 464 p.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**, 1 ed., Goiânia: Cânone Editorial, 2007. 770 p.

SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Rev At Prim Saúde** 9.1, P 83-8, 2006.

SOUZA-NETO, J. Características gerais da caprinocultura leiteira do Estado de Pernambuco. EMBRAPA-CNPC – **Boletim de pesquisa**, v.4, 1987.

STRAW, B. E. *et al.* **Disease of swine**, 8 ed.. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1999. 1209 p.

TENG, L. J. *et al.* Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. **Journal of Microbiology Immunology Infection**, China, v. 37, n. 6, p. 327-334, jun., 2004.

TOTH, I. *et al.* Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a Shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 69, n. 12, p. 7242-7247, dec., 2003.

WANI, S.A.; BHAT, M.A.; SAMANTA, I.; ISHAQ, S.M.; ASHRAFI, M.A.; BUCHH, A.S. Epidemiology of diarrhoea caused by rotavirus and *Escherichia coli* in lambs in Kashmir valley, India. **Small Ruminant Research**., v.52, p.145-153, 2004.

WHITMAN, W.B., GOODFELLOW, M., KÄMPFER, P., BUSSE, H.-J., TRUJILLO, M.E., LUDWIG, W., SUZUKI, K., Parte, A. (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 5: The Actinobacteria Originally published by Williams & Wilkins**, 1984 2nd ed. 2012, 1750 p. 297 illus.

WOODS, G.L.; WASHINGTON, J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A. *et al.* **Manual of clinical microbiology**. 6.ed. Washington: ASM Press, 1995. p.1327-1341.

ANEXO 1

Normas da Revista Ciência Animal Brasileira

DIRETRIZES PARA AUTORES

Os trabalhos podem ser redigidos em português ou inglês. Os nomes dos autores, bem como a filiação institucional de cada um dos mesmos, devem ser inseridos nos campos adequados a serem preenchidos durante a submissão e não devem aparecer no arquivo. Ciência Animal Brasileira sugere que o número máximo de autores por artigo seja 6 (seis). Artigos com número superior a 6 (seis) serão considerados exceções e avaliados pelo Conselho Editorial e, se necessário, solicitada a correção. O não atendimento de tal proposta pode implicar em recusa de sua publicação. Sugere-se um número máximo de 20 páginas e as figuras, gráficos e tabelas devem ser colocados no corpo do texto onde forem citados. É importante ressaltar que pesquisas feitas com animais devem citar a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da instituição onde o trabalho foi realizado. A falta dessa aprovação impede a publicação do artigo. Os textos devem ser organizados da seguinte forma:

Para submissões em português:

Título em português: Fonte Times New Roman 14, caixa alta, centrado, negrito;

Resumo: Fonte Times New Roman 11, espaço 1, justificado, com um máximo de 200 palavras;

Palavras-chave: idem, e no máximo 5 palavras chave;

Título em inglês (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, caixa alta, centrado;

Abstract (obrigatório): Fonte Times New Roman 11, espaço 1, justificado;

Keywords: idem

Introdução: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Material e Métodos: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Resultados: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Discussão: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5 (Os tópicos Resultados e Discussão podem ser apresentados juntos dependendo das especificidades da área);

Conclusões: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Agradecimentos: (opcional) Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Referências (e não bibliografia): Usar fonte Times New Roman 11, espaço 1 entre linhas e colocar espaço 6 pontos acima e abaixo do parágrafo. As referências devem ser numeradas na ordem em que aparecem no texto. A lista completa de referências, no final do artigo, devem estar de acordo com o estilo Vancouver (norma completa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>; norma resumida http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Para as submissões em língua inglesa, a tipografia e espaçamentos são os mesmos, na seguinte sequência:

Título em inglês (Title);

Abstract;

Keywords;

Título em português (obrigatório);

Resumo em português (obrigatório);

Palavras-chave;

Introduction;

Material and Methods;

Results and Discussion;

Conclusions;

Acknowledgments (opcional),

References

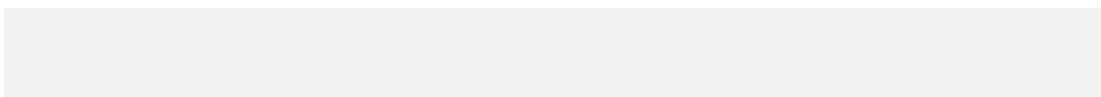
Artigos do tipo **Nota Científica, Relato de Caso e similares** não estão sendo aceitos para submissão. **Artigos de Revisão de Literatura** somente serão publicados quando solicitados por convite do Conselho Editorial.

As referências a partir de resumos simples ou expandidos e trabalhos completos em anais de eventos são, em muitas ocasiões, de difícil recuperação. Por essa razão, solicitamos que esse tipo de fonte **não** seja utilizada como referência.

Com relação às teses, dissertações e monografias, solicitamos que sejam utilizados apenas documentos dos **últimos três anos** e quando não houver o respectivo artigo científico publicado em periódico. Esse tipo de referência deve, obrigatoriamente, **apresentar o link** que remeta ao cadastro nacional de teses da CAPES e os bancos locais das universidades que publicam esses documentos no formato .pdf.

Solicita-se, também, priorizar referências de periódicos e não de livros-texto.

O editor científico pode solicitar mais informações em relação às referências no momento de editoração do artigo. Seu pronto atendimento agilizará a sua publicação. O processo de resgate fácil das informações é o ponto principal de uma referência bibliográfica, técnica ou eletrônica.



CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.
2. Os autores devem estar cientes de que são os responsáveis diretos por todo o conteúdo de seu artigo.
3. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapasse os 2MB). No arquivo da submissão, excluir apenas os nomes e identificação dos autores, todos os outros elementos (título em português e em inglês, resumo, palavras chave, abstract e key words) devem permanecer no arquivo. O preenchimento do cadastro inclui todos os autores envolvidos (máximo de 6 autores), selecionando o contato principal. Atentar para o item 6 destas normas.
4. Todos os endereços de URLs no texto (Ex.:<http://www.ibict.br>) estão ativos e prontos para clicar.
5. O texto está em espaço 1,5 com linhas numeradas; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.
6. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em **Diretrizes para Autores**, na seção Sobre a Revista.
7. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos). Os nomes de TODOS os autores, com sua respectiva identificação institucional, foi cadastrada nos metadados da submissão, usando a opção incluir autor.
8. Nos casos de artigos que envolvam pesquisa com animais, é obrigatória a inserção da aprovação pelo Comitê de Ética da instituição de origem do trabalho. Caso a pesquisa tenha envolvido questionário aplicado a pessoas, será necessário a aprovação pelo Comitê de Ética Humano da instituição, também.

DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTURAL

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

- a. Autores mantém os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a **Licença Creative Commons Attribution** que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.
- b. Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.:

publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.

- c. Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado (Veja **O Efeito do Acesso Livre**).

POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.